



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

⑪ Numéro de publication:

0 283 349
A1

⑫

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

⑬ Numéro de dépôt: 88400382.3

⑮ Int. Cl.⁴: A 61 K 35/78
A 61 K 7/48

⑭ Date de dépôt: 19.02.88

⑯ Priorité: 20.02.87 FR 8702229

⑰ Demandeur: Lamaison, Jean-Louis
21 bis, rue de Champot
F-63830 Durtol (FR)

⑰ Date de publication de la demande:
21.09.88 Bulletin 88/38

⑱ Inventeur: Lamaison, Jean-Louis
21 bis, rue de Champot
F-63830 Durtol (FR)

⑲ Etats contractants désignés:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

⑲ Mandataire: Warcoin, Jacques et al
Cabinet Régimbeau 26, avenue Kléber
F-75116 Paris (FR)

⑳ Procédé d'obtention de principes tanniques d'origine végétale, composition cosmétologique et composition pharmaceutique contenant le principe tannique purifié obtenu selon le procédé.

㉑ L'invention concerne un procédé d'obtention de principes tanniques purifiés d'origine végétale.

Selon l'invention, ce procédé comporte essentiellement les étapes suivantes : a) l'adsorption du principe tannique actif, à partir d'une solution extractive de la matière première, sur un adsorbant polymère à fonctions amides ou équivalentes ; et b) la désorption sélective et quantitative du principe tannique actif fixé sur l'adsorbant, désorption à l'aide de bases ou de substances à propriétés basiques.

L'invention a également pour objet les applications de ce principe actif utilisant ses activités anti-enzymatiques.

L'invention a en outre pour objet des compositions cosmétologiques et des compositions pharmaceutiques comportant à titre de principe actif les principes tanniques purifiés obtenus selon le présent procédé.

EP 0 283 349 A1

Description**"PROCEDE D'OBTENTION DE PRINCIPES TANNIQUES D'ORIGINE VEGETALE, COMPOSITION COSMETOLOGIQUE ET COMPOSITION PHARMACEUTIQUE CONTENANT LE PRINCIPE TANNIQUE PURIFIE OBTENU SELON LE PROCEDE".**

5 La présente invention concerne un procédé d'obtention de principes tanniques d'origine végétale purifiés, ainsi que l'application en cosmétologie et en pharmacologie des principes actifs obtenus par ledit procédé.

Plus précisément, le but de la présente invention est d'obtenir, à partir de matières premières d'origine végétale, les principes tanniques actifs sous forme d'extraits purifiés de manière pratiquement quantitative, les extraits purifiés renfermant ainsi la presque totalité des activités anti-enzymes d'origine.

10 Pour ce faire, la présente invention a pour objet un procédé d'obtention de principes tanniques purifiés d'origine végétale qui, selon sa caractéristique essentielle, comporte les étapes suivantes :

- a) l'adsorption du principe tannique actif à partir d'une solution extractive de la matière première sur un adsorbant polymère à fonctions amides ou équivalentes,
- b) la désorption sélective et quantitative du principe tannique actif fixé sur l'adsorbant, désorption à l'aide de bases ou de substances à propriétés basiques.

15 Il convient de remarquer qu'il était communément admis avant la présente invention que les tannins en général étaient dégradés, notamment par oxydation par les substances basiques et que plus particulièrement les tannins ellagiques pouvaient être saponifiés facilement en milieu alcalin avec formation de sels d'acides correspondants et donc que leur emploi comme solvants de désorption était à proscrire. Or de manière surprenante, ils se sont avérés, selon la présente invention, particulièrement appropriés pour la désorption des tannins sur polymères polyamides.

Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux, la solution peut ensuite être neutralisée par addition d'acide ou de substances à propriétés acides de quelque nature, pures ou en mélanges.

20 Avantageusement, entre l'étape d'adsorption a) et l'étape de désorption b) des substances banales de la plante sont éliminées quantitativement par lavage ou élution à l'aide de solvants.

25 Ces substances banales de la plante sont notamment des sels minéraux, sucres, protides, certaines substances phénoliques telles qu'acide-phénols, phénols et dérivés, flavones, etc.

De manière particulièrement avantageuse, la plante d'origine est la Reine des Prés - *Filipendula Ulmaria* (Flora Europaea) ou *Spiraea Ulmaria* - de la famille des Rosacées, l'espèce proprement dite, ses sous-espèces, ses variétés ou espèces affines, notamment d'origine horticole et les hybrides éventuels.

30 Les raisons du choix de cette matière première s'explique d'après les résultats très intéressants obtenus comparativement à ceux d'autres plantes ou principes actifs d'origine végétale - certains présents dans la Reine des Prés comme l'acide gallique, l'acide chlorogénique, le salicylate de méthyle, le rutoside, l'hypéroside, la quercétine-4' glucoside, principale flavone des fleurs, la quercétine et le principe tannique - et reproduits dans le tableau figurant à l'exemple 6.

35 La matière première précitée présente des activités biochimiques en tant qu'anti-enzymes et des activités physiologiques résultantes protectrices cellulaires et vasculaires.

Elle inhibe notamment diverses enzymes protéolytiques telles que l'élastase, la collagénase et l'hyaluronidase, etc., qui participent à la dégradation des trames des organites cellulaires, des membranes, des tissus tels que le tissu conjonctif par exemple ou des parois tissulaires.

40 Parmi les polymères d'absorption à fonctions amides ou équivalentes, on peut citer particulièrement les nylons, les polyamides, les polyvinylpyrrolidones, soit purs, soit mélangés entre eux ou dilués. Ces exemples n'étant nullement limitatifs bien entendu.

Avantageusement, la désorption se fait avec des bases ou des substances à propriétés basiques, fortes ou faibles, en solutions aqueuses, alcooliques, ou cétoniques pures ou en mélanges.

45 Par exemple, la substance à propriétés basiques réalisant la désorption est une solution d'hydroxyde de sodium ou une solution d'ammoniaque.

Lorsque le produit actif est désorbé à l'aide de bases ou de substances à propriétés basiques en solution, le titre de la solution est choisi de manière à ce que la désorption soit quantitative.

50 La neutralisation de la solution peut se faire par addition d'acides ou substances à propriétés acides, par utilisation de résines échangeuses d'ions, par dialyse ou tout autre procédé de séparation moléculaire.

A l'origine, la drogue fraîche ou desséchée selon un quelconque procédé peut être divisée de manière suffisante sous forme de poudre afin de faciliter l'extraction.

55 L'extraction de la matière première une fois traitée est réalisée à l'aide de solvants et effectuée suivant un procédé à chaud ou à froid à l'aide d'un appareillage d'extraction de quelque nature opérant en continu ou en discontinu de manière à ce que l'extraction soit quantitative.

Une extraction préliminaire de manière à éliminer des substances banales gênant l'extraction peut être réalisée par exemple avec un solvant de polarité différente de celui de l'extraction.

Après extraction, les parties végétales peuvent être séparées de la solution extractive à l'aide d'un appareillage adapté par exemple de filtration ou de centrifugation.

60 La solution extractive précitée peut être concentrée ou évaporée à siccité et reprise par des solvants. Parmi les solvants, notamment d'extraction ou de lavage, on peut citer :

les solvants hydroxylés par exemple l'eau, les solutions aqueuses salines, acides ou basiques, les alcools,

notamment le méthanol, l'éthanol, le propanol ou encore le propyléneglycol, le glycérol, les solvants cétoniques, notamment l'acétone, le méthyléthylcétone, les esters tels que acétate d'éthyle, acétate d'isopropyle, ou tout autre solvant à caractère relativement polaire tels que le tétrahydrofurane.

Ces solvants peuvent être utilisés soit purs, soit mélangés entre eux en quelconques proportions. 5

Comme on l'a vu, la solution de désorption peut être neutralisée et les liqueurs de désorption ainsi obtenues peuvent être ensuite traitées de manière à obtenir le produit actif sous forme sèche. Elles peuvent être concentrées de manière telle que le produit actif précipite de la solution, la précipitation étant rendue quantitative par exemple par refroidissement ou tout autre procédé permettant de quantifier cette opération.

Le produit actif peut être récupéré suivant une opération de séparation telle que par exemple une centrifugation et une filtration ou tout autre type d'opérations permettant l'élimination du liquide et la récupération du produit actif sous forme solide. 10

Le principe actif peut alors être soumis à une opération de dessiccation de quelque nature de manière à obtenir un produit suffisamment sec pour pouvoir être réduit en poudre.

Le principe actif peut ainsi être utilisé sous forme sèche ou sous forme liquide, par exemple en solution dans des solvants tels que ceux précités. 15

Dans un mode de réalisation particulier, la solution extractive est extraite de poudre de fleurs de Reine des Prés. Puis elle est filtrée, puis concentrée jusqu'à élimination du solvant. Le résidu est ensuite repris avec de l'eau, soumis à une température supérieure à la température ambiante de manière à faciliter la dissolution. La solution aqueuse obtenue est déposée en tête d'une colonne contenant de la poudre de polymère polyamide. Après adsorption de la solution aqueuse la colonne est lavée avec un solvant, la matière banale étant ainsi éliminée. L'élution est ensuite réalisée à l'aide de solutions hydroalcooliques et d'hydroxyde de sodium ou d'ammoniaque, l'éluat étant neutralisé en cours d'élution avec de l'acide chlorhydrique ou de l'acide acétique. La solution est ensuite soumise à la dialyse, puis la liqueur de dialyse est concentrée jusqu'à apparition d'un précipité par exemple à l'aide d'un évaporateur rotatif sous pression réduite. La liqueur concentrée est ensuite réfrigérée à 4°C de manière à quantifier la précipitation. La liqueur est filtrée sur un bûchner. Le précipité est lavé et séché. Le produit sec est alors pulvérisé. 20

L'invention a également pour objet les applications de ce principe actif utilisant leurs activités anti-enzymatiques.

L'invention a en outre pour objet des compositions cosmétologiques et des compositions pharmaceutiques comportant à titre de principe actif les principes tanniques purifiés obtenus selon le présent procédé. 30

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lumière de la description présentée sous forme d'exemples.

EXEMPLE 1 - ORIGINE DE LA MATIERE PREMIERE

La plante d'origine est la Reine des Prés -Filipendula Ulmaria (Flora Europaea) = Spiraea Ulmaria -de la famille des Rosacées, l'espèce proprement dite, ses sous-espèces, ses variétés ou espèces affines, notamment d'origine horticole et les hybrides éventuels.

La plante très cosmopolite peut être à l'origine soit sauvage, soit cultivée.

La matière première - ou drogue - est constituée par les fleurs ou parties de fleurs, les sommités fleuries ou tout autre partie végétale de composition analogue. 40

EXEMPLES 2 A 4 - PREPARATION DE L'EXTRAIT ACTIF

Exemple 2

1 kg de poudre de fleurs de Reine des Prés (tamis 250) sont extraits à chaud dans un appareil d'extraction en continu de type SOXHLET à l'aide de 15 litres d'éthanol à 80 pour cent V/V pendant 48 heures jusqu'à épuisement de la poudre. 45

Après refroidissement, la liqueur extractive est filtrée sur papier.

La solution extractive est concentrée jusqu'à consistance semi-pâteuse en opérant à l'aide d'un évaporateur rotatif sous pression réduite. 50

Le résidu est repris avec 2 litres d'eau injectés directement dans le ballon d'évaporation agité par rotation et soumis à une température de 50°C pendant 10 minutes, de manière à faciliter la dissolution.

La solution aqueuse est déposée en tête d'une colonne de 15 cm de diamètre et de 100 cm de hauteur, contenant 1 kg de poudre de polyamide préalablement lavée avec 10 litres d'éthanol à 96° puis avec 10 litres d'eau. 55

Après adsorption de la solution aqueuse, la colonne est lavée avec 20 litres d'eau puis avec 20 litres d'éthanol à 96°, les matières banales étant ainsi éliminées.

L'élution est réalisée à l'aide de 20 litres de solution hydroalcoolique à 50 pour cent V/V d'hydroxyde de sodium 0,2 N, l'éluat étant neutralisé en cours d'élution avec de l'acide chlorhydrique 1 N en utilisant un titrimètre automatique. 60

La solution est introduite dans des boudins à dialyse et soumise à une dialyse pendant 48 heures dans un bac à circulation d'eau à 12°C.

La liqueur de dialyse est concentrée à l'aide d'un évaporateur rotatif sous pression réduite jusqu'à apparition d'un précipité pour un volume d'environ un litre. 65

La liqueur concentrée est réfigérée à + 4°C pendant une nuit, de manière à quantifier la précipitation. La liqueur est filtrée sur bûchner à l'aide d'une fiole à vide de manière à bien essorer le précipité.

Le précipité est séché dans un étuve à soufflerie à une température de 70°C pendant 24 heures. Le produit sec est alors pulvérisé dans un broyeur à couteaux de manière à obtenir une poudre passant au tamis module 250.

5 tamis module 250.
On obtient ainsi 40 grammes de poudre constituant le principe actif, tannin de nature probablement ellagique.

Exemple 3

10 1 kg de poudre de fleurs de Reine des Prés (tamis 250) sont extraits à chaud dans un appareil d'extraction en continu de type SOXHLET à l'aide de 15 litres d'éthanol à 80 pour cent V/V pendant 48 heures jusqu'à épuisement de la poudre.

Après refroidissement, la liqueur extractive est filtrée sur papier.
La solution extractive est concentrée jusqu'à élimination de l'alcool à l'aide d'un évaporateur sous pression réduite.

15 Le résidu est repris avec 2 litres d'eau injectés directement dans le ballon d'évaporation agité par rotation et soumis à une température de 50°C pendant 10 minutes, de manière à faciliter la dissolution.

La solution aqueuse est déposée en tête d'une colonne de 15 cm de diamètre et de 100 cm de hauteur, contenant 1 kg de poudre de Nylon préalablement lavée avec 10 litres d'éthanol à 96° puis avec 10 litres d'eau.

20 Après adsorption de la solution aqueuse, la colonne est lavée avec 20 litres d'eau, puis avec 20 litres d'éthanol à 96°, les matières banales étant ainsi éliminées.

L'élution est réalisée à l'aide de 5 litres de solution hydroalcoolique à 50 % V/V d'ammoniaque 2 N, l'éluat étant neutralisé en cours d'élution avec de l'acide acétique en utilisant un titrimètre automatique et un récipient réfrigéré.

25 La solution est concentrée à l'aide d'un évaporateur rotatif sous pression réduite jusqu'à précipitation, soit un volume d'environ un litre.

La liqueur concentrée est réfigérée à + 4°C pendant une nuit, de manière à ce que la précipitation soit quantitative.

La liqueur est filtrée sur Büchner à l'aide d'une fiole à vide de manière à bien essorer le précipité.

30 Le précipité est lavé directement sur le filtre avec deux fois 100 ml d'eau, puis essoré.

Le précipité est séché dans une étuve à soufflerie à une température de 70°C environ pendant 24 heures. Le produit sec est alors pulvérisé dans un broyeur à couteaux de manière à obtenir une poudre passant au tamis module 250.

On obtient ainsi 36 grammes de poudre constituant le principe actif.

35

Exemple 4

1 kg de poudre de fleurs de Reine des Prés (tamis 250) sont extraits à chaud dans un appareil d'extraction en continu de type SOXHLET à l'aide de 15 litres d'éthanol à 80 pour cent V/V pendant 48 heures jusqu'à épuisement de la poudre.

Après refroidissement, la liqueur extractive est filtrée sur papier.

La solution extractive est concentrée jusqu'à élimination de l'alcool à l'aide d'un évaporateur sous pression réduite.

Le résidu est repris avec 2 litres d'eau injectés directement dans le ballon d'évaporation agité par rotation et soumis à une température de 50°C pendant 10 minutes, de manière à faciliter la dissolution, contenant 1

kg de poudre de polyamide préalablement lavée avec 10 litres d'éthanol à 96°, puis avec 10 litres d'eau.

Après adsorption de la solution aqueuse, la colonne est lavée avec 20 litres d'eau, puis avec 20 litres d'éthanol à 96°, les matières banales étant ainsi éliminées.

L'élution est réalisée à l'aide de 2,5 litres de solution hydroalcoolique à 50 pour cent V/V d'hydroxyde de sodium 2 N, l'éluat étant neutralisé en cours d'élution avec de l'acide chlorhydrique en utilisant un titrimètre automatique et un récipient réfrigéré.

La solution est concentrée à l'aide d'un évaporateur rotatif sous pression réduite jusqu'à un volume d'environ un litre.

La liqueur est filtrée sur Büchner à l'aide d'une fiole à vide de manière à bien essorer le précipité, après réfigération à 4°C pendant une nuit.

Le précipité est lavé directement sur le filtre avec deux fois 100 ml d'eau, puis essoré.

Le précipité est séché dans une étuve à soufflerie à une température ne dépassant pas 70°C pendant 24 heures.

Le produit sec est alors pulvérisé dans un broyeur à couteaux de manière à obtenir une poudre passant au tamis module 250.

On obtient ainsi 33 grammes de poudre constituant le principe actif.

EXEMPLE 5 - CONTROLE DU PRINCIPE ACTIF

Ci-après sont décrits les caractères du principe actif lorsqu'il est obtenu sous forme sèche en poudre.

5 - 1 - Composition :

Le principe actif est constitué par les tannins actifs purifiés de la plante d'origine, à l'exclusion de tout autre constituant en quantité notable.

La teneur en tannin par rapport au poids sec est au moins égale à 95 pour cent.

5

5 - 2 - Caractères et solubilités :

Poudre de couleur gris brun pratiquement inodore, de saveur astringente, peu soluble dans l'eau, plus soluble dans les solutions acides ou basiques, hydroalcooliques ou hydrocétoniques, pratiquement insoluble dans les solvants organiques tels que l'éther, les solvants chlorés, etc.

10

5 - 3 - Identification :

Le produit présente les réactions colorées générales des tannins telles que sels ferriques, bleu solide, etc., et se fixe sur les supports polyamidés, précipite la gélatine en solution, etc.

Il présente des valeurs maximales dans l'U.V. aux longueurs d'onde voisines de 275 nm et de 225 nm, comme par exemple dans l'éthanol à 50 % V/V.

15

Dans l'infrarouge, pastillé dans le KBr, il présente des signaux caractéristiques des hydroxyles au-delà de 3 000 cm⁻¹, des fonctions esters à environ 1 700 cm⁻¹, des noyaux aromatiques à environ 1 500 cm⁻¹ qui sont les bandes principales.

Le principe actif peut être caractérisé par CCM, dans les conditions suivantes par exemple :

20

- support : gel de silice G - solvant de migration : acétate d'éthyle - acide formique - eau : 5 : 3 : 1 V/V/V
- réactif de révélation : UV à 254 nm - dépôt : 5 µl de solution à 0,5 pour cent m/V dans l'éthanol à 50 pour cent V/V - distance de migration : 10 cm - résultat : taches foncées de Rf voisins de 0,50.

5 - 4 - Essai :

Teneur en eau : déterminée selon la méthode CODEX de perte à la dessiccation, à l'étuve à 100-105°C, la teneur en eau "h" ne devra pas être supérieure à 10 pour cent.

25

Taux de matières minérales : déterminé selon la méthode CODEX des cendres totales, le taux de matières minérales ne devra pas être supérieur à 0,5 pour cent.

5 - 5 - Dosage des tannins

Déterminé selon la méthode d'adsorption sur la poudre de peau, le titre en tannin devra être au moins égal à 95 pour cent, rapporté au produit sec.

30

On peut opérer par exemple selon le mode suivant.

On agite mécaniquement pendant 30 minutes 250 ml de solution à 0,5 pour cent m/V dans l'éthanol à 50 pour cent V/V avec 10 g de poudre de peau préchromée, puis filtre, évapore à siccité à l'aide d'un évaporateur rotatif 200 ml de filtrat et pèse le résidu, soit m en grammes.

35

Titre en tannin :

$$(1 - m) \times 100 \times \frac{100}{100-h}$$

40

45

5 - 6 - Dosage biologique :

Déterminé selon la méthode de SHINOGI (J. Pharm. Sci., 1985, 74 (4), 482-485) la dose de principe actif produisant une activité inhibitrice de 50 % (I 50) vis-à-vis de l'élastase pancréatique porcine avec comme substrat le tertio-butylcarbonylalanine p-nitrophénol (Boc-Ala-ONp) devra être de :

50

1 µg ± 15 %

EXEMPLE 6 - ACTIVITE BIOLOGIQUE DU PRINCIPE ACTIF

Le principe actif ainsi préparé présente des activités inhibitrices très importantes, vis-à-vis notamment de diverses enzymes protéolytiques telles que les élastase, collagénase et hyaluronidase. Les résultats figurent dans le tableau suivant dans lequel les résultats sont exprimés en masse d'inhibiteur (en µg), soit rapportée à la drogue sèche d'origine, soit réelle pour les principes définis, produisant une inhibition de l'activité enzymatique de 50 % (I 50) dans les conditions des essais. Le signe (-) indique une activité inhibitrice nulle.

55

60

65

I 50 (µg)						
	Inhibiteur	Elas-tase	Collagé-nase	Hyalu-roni-dase	Trip-sine	α-Chymotryp-sine
5						
10	Reine des Prés fleur	10	40	30	30	35
15	Alchémille plante	2500	8×10^3	10^4	5×10^3	$7,5 \times 10^3$
20	Rhubarbe racine	50	150	240	90	130
25	Acide tannique	50				
30	Acide gallique	100				
35	Hamamélitanin	600				
40	Gallate de propyle	-				
45	Catéchine-épicatéchine	35				
50	Ac. chlorogénique	-				
55	Salicylate de méthyle	-				
60	Ethoxazo-rutine	250				
65	Rutoside	150				
	Hypéroside	275				
	Quercétine 4'-Glucoside	250				
	Quercétine	55				
	Morine	60				
	Principe tannique de <u>Filipendula Ulmaria</u>	1	5	6	3,5	5

55

60

65 Il faut noter que ces activités sont très constantes suivant les lots de préparation.

6 - 1 - Protocoles des mesures des activités anti-enzymatiques :

a) Activités inhibitrices de l'élastase, de la trypsine et de l'α-chymotrypsine :

Les dosages d'activités inhibitrices de l'élastase, de la trypsine et de l'α-chymotrypsine ont été réalisés selon la méthode de SHINOGI et al. (1), la quantité d'inhibiteur étant adaptée de manière à obtenir une inhibition voisine de 50 % (I50) après 30 minutes, les extraits étant généralement préparés à partir de 0,5 g de poudre (250) de plante sèche dans 20 ml d'éthanol à 50 % V/V, les principes définis en solution à 1 mg/ml d'éthanol à 50 % V/V.

(1) SHINOGI M., AGHA B.J., TSUJI K. and DIGENIS G.A. Assessment of antiprotease activity of some carbamate derivatives, J. Pharm. Sci., 1985, 74 (4), 482-485.

b) Activités inhibitrices de la collagénase :

Les dosages d'activités inhibitrices de la collagénase ont été réalisés selon la méthode viscosimétrique de Mac CARTNEY et al. (2) à l'aide d'un viscosimètre de type OSTWALD à tube capillaire permettant une mesure du temps d'écoulement pour l'eau à 27°C d'environ 30 secondes.

(2) Mac CARTNEY H.W., BATES S.R.E., BLUMSON N.L., NELSON D., JAMISON D. and ELMORE D.T. A recording viscometer for assaying mammalian collagenase, Biochem. J., 1983, 213, 275-278.

Pour les mesures d'activités inhibitrices 2,5 ml de collagénase (Sigma type IV à 2 µg/ml) en solution dans le tampon 0,05 M Tris/HCl pH 7,4 contenant 5mM de CaCl₂ sont mis à incuber à 27°C pendant 10 minutes avec 100 µl d'inhibiteur en solution dans l'éthanol à 50 % V/V, la quantité d'inhibiteur étant adaptée, les extraits végétaux et les principes définis préparés comme précédemment. Le substrat (2,5 ml de collagène SIGMA type III à 0,1 % V/V dans le même tampon) également thermostaté est alors ajouté. Les mesures de temps d'écoulement sont effectuées au départ puis toutes les 15 minutes pendant une heure, soit "t" la mesure après une heure.

On peut opérer par rapport à un témoin contenant 100 µl d'éthanol à 50 % V/V sans inhibiteur, soit "to" la mesure après une heure, puis calculer la masse d'inhibiteur I50 en fonction du % d'inhibition obtenu dans les conditions de l'essai.

$$\% \text{ d'inhibition} : \frac{to - t}{to} \times 100$$

c) Activité inhibitrice de l'hyaluronidase :

Les dosages d'activités inhibitrices de l'hyaluronidase ont été réalisés selon la méthode de réduction turbidimétrique de l'USP XX (United States Pharmacopoeia, 1980, 20, 376-377).

Pour les méthodes d'activités inhibitrices, 1 ml de solution d'hyaluronidase (SIGMA III-P à 0,75 unités/ml) sont mis à incuber à 37°C pendant 10 minutes avec 100 µl d'inhibiteur en solution dans l'éthanol à 50 % V/V, la quantité d'inhibiteur étant adaptée et les préparations effectuées comme précédemment. Le substrat (1 ml de solution d'hyaluronate de potassium à 0,25 mg/ml) également thermostaté est alors ajouté. Après incubation pendant 30 minutes à 37°C, 8 ml de solution de sérum sont ajoutés et la densité optique lue au spectrophotomètre à 640 nm après 30 minutes à température ambiante, soit D par rapport à un blanc sans hyaluronate.

On peut opérer par rapport à un témoin contenant 100 µl d'éthanol à 50 % V/V sans inhibiteur, soit Do par rapport à un blanc sans hyaluronate, puis calculer la masse d'inhibiteur I50 d'après le % d'inhibition obtenu dans les conditions de l'essai

$$\% \text{ d'inhibition} : \frac{Do - D}{Do} \times 100.$$

d) Application :

Le principe actif tannique de la Reine des Prés présente, du fait de ses activités, un effet anti-vieillissement général sur les organismes vivants par restauration notamment de l'intégrité du tissu conjonctif.

Il s'agit donc d'un produit anti-vieillissement, agissant en tant que protecteur cellulaire vis-à-vis d'agressions très diverses par fixation membranaire, pariétale ou tissulaire et par inhibition des enzymes dégradant la trame des membranes, des parois et des tissus d'organes très divers.

Il s'ensuit des propriétés très variées utilisables industriellement, notamment en médecine humaine et vétérinaire, en pharmacie, en cosmétologie, en diététique, etc., et dans tous autres domaines d'application

également protégés.

Ainsi, par exemple, sont en outre indiquées des applications telles que les suivantes :

- en cosmétologie : produit anti-vieillissement, améliore les propriétés toni-élastiques de la peau (anti-élastase, anti-collagénase, etc..) au niveau facial (anti-rides, etc..), corporel (raffermissement des seins, anti-cellulite, etc..) ou capillaire (tonique du cuir chevelu, anti-chute, etc..) ; produit adoucissant, etc.
- 5 - en dermatologie : produit antiinflammatoire, restaure les propriétés toni-élastiques de la peau, améliore la circulation (vergetures, lipodystrophies, couperose, etc..), anti-infectieux en tant que antibactérien, antifongique et antiviral (acnès, points noirs, surinfections, etc..), cicatrisant, etc.., au niveau corporel, facial ou du cuir chevelu :
- 10 - en cardioangiologie : comme protecteur vasculaire veineux (varices, hémorroïdes, etc..), rétinien, cérébral, etc.., par voie générale ou locale, comme antiathéromateux et hypolipémiant, comme anti-angoreux, etc. ;
- en gastro-entérologie : comme antiinflammatoire et hémostatique (anti-ulcère, etc..), anti-infectieux et antidiarrhéique, etc. ;
- en gynécologie : en usage local comme hémostatique utérin, anti-infectieux, contraceptif, etc. ;
- 15 - en hématologie : comme hémostatique par voie générale ou locale (hémophilie, etc..), etc. ;
- en rhumatologie : comme antiinflammatoire (rhumatismes divers, etc..), etc., en usage local ou per os ;
- en stomatologie : comme protecteur du tissu gingival, antihémorragique, anti-infectieux, anti-inflammatoire (parodontoses, etc..) en usage local ou per os ;
- en urologie et néphrologie : comme anti-prostatique, etc. ;
- 20 - comme anti-infectieux général ; antibactérien, antifongique, antiviral, etc. ;
- en diabétologie : diabète gras, etc.

EXEMPLE 7 - TOXICOLOGIE

Des essais d'innocuité effectués classiquement chez le rat ont montré la bonne tolérance générale du principe actif, aucune toxicité n'ayant été observée aux doses maximales administrables par voie orale ou par voie parentérale.

Des essais effectués chez des femmes volontaires ont également montré l'innocuité du produit en application locale.

Il faut signaler la non toxicité généralement reconnue de la Reine des Prés, qui figure d'une part, dans la liste de plantes en vente libre en dehors des officines et des herboristeries - Décret n° 79-480 du 15 juin 1979 (J.O. 22-6-1979), choisies notamment en raison de leur absence de toxicité et, d'autre part, dans la liste de 72 plantes médicinales pour tisanes (B.O. du 7-3-1985) élargie depuis à 112 plantes pour les spécialités pharmaceutiques à base de plantes (B. O. n° 86/20 bis d'août 1986) pouvant bénéficier sous certaines conditions d'un dossier allégé de demande d'Autorisation de Mise sur le Marché.

EXEMPLE 8 - FORMES GALENIQUES

8 - 1 - Comprimés dragéifiés entériques :

Principe tannique de Filipendula Ulmaria 0,010 g Excipient* q.s.p. un comprimé à enrobage entérique. Excipient* : lactose, silice, stéarate de magnésium, polyvidone, phtalate de diéthyle, saccharose, talo, acétophthalate de cellulose, gomme arabique, oxyde de titane, sesquioxide de fer, cire blanche, cire de Carnauba Q.S.

45 8 - 2 - Soluté buvable : Ampoules de 2 ml. Principe tannique de Filipendula Ulmaria 0,010 g

Excipient :

Alcool à 95° 1 ml

Eau purifiée q.s.p. 2 ml.

50 8 - 3 - Soluté injectable : Ampoules de 2 ml. Principe tannique de Filipendula Ulmaria 0,010 g

Excipient :

Monopropylène-glycol 1 ml

Eau p.p.i. q.s.p. 2 ml.

55 8 - 4 - Crème : Principe tannique de Filipendula Ulmaria 0,5 g

Excipient :

Mono et diglycérides de l'acide palmitique 8 g

60 Alcool cétylique 2 g

Alcool cétostéarylque 1 g

Cétostéarate de polyoxyéthylène 1 g

Monooléate de glycérol 1 g

2-Octyl dodécanol 8 g

65 Triglycéride de l'acide caprylique 3 g

Huile de paraffine fluide 3 g
 Acide polyacrylique réticulé 0,3 g
 Triéthanolamine 0,8 g
 Parfum, conservateur, eau purifiée q.s.p. 100 g

5

8 - 5 - Gel :Principe tannique de *Filipendula Ulmaria* 0,5 g

Excipient

Acide polyacrylique réticulé 0,6 g
 Triéthanolamine 0,6 g
 Monopropyléneglycol 45 g
 Parfum, conservateur, eau purifiée q.s.p. 100 g

10

Revendications

1. Procédé d'obtention de principes tanniques purifiés d'origine végétale, caractérisé en ce qu'il comporte essentiellement les étapes suivantes :

20

- a) l'adsorption du principe tannique actif, à partir d'une solution extractive de la matière première, sur un adsorbant polymère à fonctions amides ou équivalentes, et
- b) la désorption sélective et quantitative du principe tannique actif fixé sur l'adsorbant, désorption à l'aide de bases ou de substances à propriétés basiques.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la solution est ensuite neutralisée par addition d'acide ou de substances à propriétés acides pures ou en mélanges.

25

3. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que, entre l'étape d'adsorption a) et l'étape de désorption b) des substances banals de la plante sont éliminées quantitativement par lavage ou élution à l'aide de solvants.

30

4. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la plante d'origine est la Reine des Prés - *Filipendula Ulmaria* (Flora Europaea) ou *Spiraea Ulmaria* - de la famille des Rosacées, l'espèce proprement dite, ses sous-espèces, ses variétés ou espèces affines, notamment d'origine horticole et les hybrides éventuels.

35

5. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que les polymères d'adsorption à fonctions amides ou équivalentes sont choisis parmi notamment les nylons, les polyamides, les polyvinylpyrrolidones, soit purs, soit mélangés entre eux ou dilués.

40

6. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la désorption se fait avec des bases ou des substances à propriétés basiques, fortes ou faibles, en solutions aqueuses, alcooliques, ou cétoniques, pures ou en mélanges, le titre choisi de manière à ce que la désorption soit quantitative.

45

7. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la substance à propriétés basiques réalisant la désorption est une solution d'hydroxyde de sodium ou une solution d'ammoniaque.

50

8. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la neutralisation de la solution après l'étape b), neutralisation par addition d'acides ou substances à propriétés acides peut se faire par utilisation de résines échangeuses d'ions, par dialyse ou tout autre procédé de séparation moléculaire.

55

9. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'extraction a lieu à partir de la drogue fraîche ou desséchée divisée de manière suffisante sous forme de poudre selon un quelconque procédé, l'extraction a lieu à l'aide de solvants d'extraction et est effectuée suivant un procédé à chaud ou à froid avec un appareillage d'extraction de quelconque nature opérant en continu ou en discontinu de manière à ce que l'extraction soit quantitative.

60

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'une extraction préliminaire, de manière à éliminer des substances banals gênant l'extraction, peut être réalisée par exemple avec un solvant de polarité différente de celui de l'extraction.

65

11. Procédé selon les revendications 9 et 10, caractérisé en ce que, après extraction et avant purification, les parties végétales peuvent être séparées de la solution extractive à l'aide d'un appareillage adapté par exemple de filtration ou de centrifugation et, enfin, la solution extractive peut être concentrée ou évaporée à siccité et reprise par des solvants.

70

12. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que les solvants, notamment d'extraction ou de lavage, sont choisis parmi :

75

- les solvants hydroxylés par exemple l'eau, les solutions aqueuses salines, acides ou basiques, les alcools, notamment le méthanol, l'éthanol, le propanol ou encore le propyléneglycol, le glycérol,
- les solvants cétoniques, notamment l'acétone, le méthyléthylcétone,
- les esters tels que acétate d'éthyle, acétate d'isopropyle,

80

ou tout autre solvant à caractère relativement polaire, tels que le tétrahydrofurane, ces solvants pouvant être utilisés soit purs, soit mélangés entre eux en quelconques proportions.

13. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que les liqueurs de désorption ainsi obtenues peuvent être ensuite traitées de manière à obtenir le produit actif sous forme sèche, par exemple les liqueurs de désorption obtenues peuvent être concentrées de manière telle que le produit actif précipite de la solution, la précipitation étant rendue quantitative par exemple par refroidissement ou tout autre procédé permettant de quantifier cette opération, et le produit actif peut être récupéré suivant une opération de séparation, telle que par exemple une cen trifugation, une filtration ou tout autre type d'opérations permettant l'élimination du liquide et la récupération du produit actif sous forme solide, le principe actif étant ensuite soumis à une opération de dessiccation de quelconque nature, de manière à obtenir un produit suffisamment sec pour pouvoir être réduit en poudre.

14. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la solution extractive est extraite de poudre, de fleurs de Reine des Prés, puis elle est filtrée, puis concentrée jusqu'à élimination du solvant, le résidu est ensuite repris avec de l'eau, soumis à une température supérieure à la température ambiante de manière à faciliter la dissolution, la solution aqueuse obtenue est déposée en tête d'une colonne contenant de la poudre de polymère polyamidé, après adsorption de la solution aqueuse, la colonne est lavée avec un solvant, la matière banale étant ainsi éliminée, l'éluion est ensuite réalisée à l'aide de solutions hydroalcooliques et d'hydroxyde de sodium ou d'ammoniaque, l'éluat étant neutralisée en cours d'éluion avec de l'acide chlorhydrique ou de l'acide acétique, la solution est ensuite soumise à la dialyse, puis la liqueur de dialyse est concentrée jusqu'à apparition d'un précipité par exemple à l'aide d'un évaporateur rotatif sous pression réduite, la liqueur concentrée est ensuite réfrigérée à 4°C de manière à quantifier la précipitation, la liqueur est filtrée sur un bûchner, le précipité est lavé et séché, le produit sec est alors pulvérisé.

15. Application du principe actif sous forme sèche ou sous forme liquide obtenu selon le procédé d'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'on utilise ses activités anti-enzymatiques.

16. Composition cosmétologique selon la revendication 15, caractérisée en ce qu'elle comporte, à titre de principe actif, les principes tanniques purifiés obtenus selon le procédé des revendications précédentes.

17. Composition pharmaceutique selon la revendication 15, caractérisée en ce qu'elle comporte, à titre de principe actif, les principes tanniques purifiés obtenus selon le procédé des revendications précédentes.

35

40

45

50

55

60

65



DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 81, no. 10, 9 septembre 1974, page 317, résumé no. 54372p, Columbus, Ohio, US; N.N. NOVIKOVA: "Application of Filipendula ulmaria for some therapeutic preparations", & NAUCH. TR., PERM. FARM. INST. 1973, 5(2), 27-30 * Résumé * ---	1, 4, 9-17	A 61 K 35/78 A 61 K 7/48
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 88, no. 3, 16 janvier 1978, page 318, résumé no. 19061j, Columbus, Ohio, US; O.D. BARNAULOV et al.: "Chemical composition and primary evaluation of the properties of preparations from Filipendula ulmaria (L.) Maxim flowers", & RASTIT. RESUR. 1977, 13(4), 661-9 * Résumé * ---	1, 4, 9-17	
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 75, no. 6, 9 août 1971, page 275, résumé no. 40301d, Columbus, Ohio, US; N.N. NOVIKROVA: "Use of Filipendula ulmaria in medicine", & TR. PERM. FARM. INST. 1969, no. 3, 267-70 * Résumé * -----	1, 4, 9-17	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4) A 61 K
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche	Date d'achèvement de la recherche	Examinateur	
LA HAYE	24-05-1988	REMPP G. L. E.	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

This Page Blank (uspto)